
4.2.- MÉTODO

En la descripción de los métodos que aplicamos, existen algunos puntos comunes como son: la preparación de los reactivos que se van a utilizar, la obtención de los diferentes tipos de muestras en soportes distintos, y los pasos a seguir para realizar la *prueba de Adler*.

Para evitar repeticiones innecesarias, los describiremos previamente y, al explicar detalladamente cada uno de los procedimientos, nos referiremos a ellos de forma escueta.

I.- Preparación del reactivo

El reactivo de ADLER se debe preparar extemporaneamente según el método siguiente:

Poner en un vaso de precipitados limpio y seco, 10 ml de ácido acético glacial, que medimos en una probeta. A continuación, vamos añadiendo pequeñas cantidades de bencidina, agitando hasta que se disuelva totalmente. Seguiremos añadiendo bencidina hasta que no sea posible disolverla más, obteniendo al final una solución de color caramelo.

Si fuera necesario, filtraremos el reactivo para eliminar el exceso de bencidina que puede quedar sin disolver.

La disolución saturada de bencidina en ácido acético es lo que conocemos como reactivo de ADLER. Llenamos un frasco cuentagotas con reactivo y le ponemos una etiqueta que indique su composición y la fecha de preparación.

II.- Preparación de las disoluciones de sangre

En un tubo de ensayo, ponemos 1 ml de la muestra de sangre que hemos obtenido previamente. Para medir el volumen de muestra utilizamos una pipeta de 1 ml. A continuación añadimos 9 ml de agua destilada, para obtener una disolución de concentración 1/10 en sangre.

La concentración de las muestras las medimos en ml de sangre por ml totales. Con 1 ml de la disolución 1/10 y diluyendo hasta 10 ml, preparamos la disolución de concentración 1/100, y siguiendo el mismo procedimiento, es decir pipeteando 1 ml de una disolución y añadiendo 9 ml de agua destilada, obtenemos disoluciones de concentración 1/1000, 1/10000, y 1/100000. Después preparamos cuatro tubos de ensayo en los que ponemos, en cada uno de ellos, 2 ml de la disolución de concentración 1/100000. A continuación añadimos 2 ml de agua destilada al primer tubo, 4 ml al segundo, 6 al tercero y 8 al cuarto para obtener disoluciones de concentración 1/200000, 1/300000, 1/400000 y 1/500000 respectivamente.

Preparamos además un tubo de ensayo con sangre sin diluir, que utilizamos para realizar las pruebas de control. Todos los tubos deben llevar una etiqueta en la que se indica la concentración y la fecha de preparación de la muestra.

III.- Preparación de las muestras

1.- Muestras de sangre en tubo de ensayo:

Para cada dilución sobre la que trabajamos, preparamos 3 tubos que contengan cada uno 1 ml de la muestra de sangre. De esta forma, cada prueba la realizaremos 3 veces, para confirmar los resultados obtenidos.

2.- Manchas en papel:

Utilizamos papel de filtro como soporte. Cortamos varias tiras de papel de un tamaño aproximado de 3 por 12 cm, sobre las que obtenemos las manchas. Para esto, necesitamos un cuentagotas, de forma que podemos controlar que cada mancha consta de 5 gotas de la muestra de sangre que estamos estudiando.

Para cada dilución formamos 6 manchas. Utilizamos 3 de ellas para aplicar la *prueba de Adler* directamente y las otras 3 para obtener la *huella de Taylor* y comprobar la sensibilidad de la prueba sobre ella.

De la muestra de sangre sin diluir, también hacemos manchas que a su vez sirven para realizar las pruebas de control que describiremos más adelante. Debemos indicar sobre el papel de filtro las concentraciones de las manchas y la fecha de preparación de las mismas.

3.- Obtención de la *huella de Taylor*:

La *prueba de Adler* la realizamos también sobre la *huella de Taylor*. Para obtenerla, tomamos un trozo de papel de filtro humedecido con agua destilada y lo ponemos sobre la mancha que vamos a estudiar presionando ligeramente mediante un rodillete de presión. Sobre la huella que queda en el papel aplicamos las pruebas correspondientes.

IV.- Práctica de la prueba de ADLER:

Añadimos a la muestra con la que estamos trabajando, 2 gotas del reactivo que hemos preparado según el procedimiento descrito en el punto I del método experimental. Si no se produce cambio de color, ponemos 2 gotas de peróxido de hidrógeno. Si la prueba es positiva, la disolución adquiere rápidamente un color azul intenso como consecuencia del viraje del reactivo.

Tenemos que recordar que el cambio de color se debe observar antes de que pase un tiempo de 10 segundos desde que añadimos el peróxido de hidrógeno.

V.- Consideraciones Generales:

Debemos señalar que como nuestro trabajo tiene como objetivo el estudio de la identificación de una sustancia, es imprescindible evitar toda posible contaminación, tanto de la muestra, como de los reactivos, por agentes que puedan interferir en el análisis. De aquí que se extremen las precauciones a la hora de preparar el material que vamos a utilizar. Elegiremos pipetas y cuentagotas distintos para cada reactivo y muestra. No debemos poner nunca las pipetas y cuentagotas sobre la mesa, sino en un vaso alto que contiene agua destilada, y una vez utilizados, los dejaremos en otro vaso distinto también con agua.

Todo el material de vidrio lo limpiaremos con agua y jabón, enjuagándolo posteriormente con agua corriente y después con agua destilada. También recordaremos que cuando se añaden los reactivos a la muestra, es importante no introducir las pipetas y cuentagotas en los tubos de ensayo donde se encuentra la misma para evitar que puedan contaminarse.

Con todo esto intentamos evitar resultados erróneos, y que nuestras experiencias sean reproducibles si se mantienen las condiciones indicadas con respecto a la preparación de muestras y reactivos.

VI.- Cuaderno de Laboratorio:

El cuaderno que utilizamos durante la realización de las experiencias propuestas, lo consideramos como un instrumento más de trabajo, puesto que si tenemos anotados todos los procedimientos, incidencias y resultados que se desarrollan durante la sesión de laboratorio, reflejando incluso aquellos hechos que, en principio, parece que no son importantes, podemos tener una ayuda importante en el momento de encontrar la explicación a posibles errores, o cuando debemos interpretar los resultados.

Además tendremos la posibilidad de repetir un ensayo de la misma forma en que se realizó en su momento, ya que tenemos una descripción de cada uno de los pasos que se han seguido, así como de las posibles modificaciones que hayamos hecho sobre la marcha a la vista de los resultados obtenidos, sin que estuvieran previstas en un principio.

Una vez expuestos los pasos comunes que se van a repetir en la investigación, pasamos a describir los métodos experimentales correspondientes a los objetivos propuestos, incluyendo al final de cada uno de ellos un esquema de los pasos fundamentales.

Primer objetivo. Método experimental:
--

OBJETIVO: Estudiar la sensibilidad de la *prueba de Adler*

- 1.- Obtener la muestra de sangre: realizamos las pruebas a partir de sangre recién extraída por punción venosa. La muestra la guardamos en un tubo de ensayo preparado con heparina como anticoagulante.
 - 2.- Preparar el reactivo de ADLER
 - 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
 - 4.- Preparación de las disoluciones de sangre.
 - 5.- Obtener las manchas en papel
 - 6.- Estudiar la *prueba de Adler* en muestras de sangre líquidas:
 - 6.1.- Prueba de control: Ponemos en un tubo de ensayo, 1 ml de muestra de sangre que contiene el tubo de control que hemos preparado anteriormente según el procedimiento descrito en el punto II. A continuación realizamos la *prueba de Adler* sobre la muestra. Con esta prueba nos aseguramos de que los reactivos que hemos preparado funcionan correctamente y por lo tanto podemos pasar a comprobar la validez de la prueba en las muestras correspondientes a distintas diluciones de sangre. Además es importante tener un control del color que se obtiene si la reacción es positiva, para evitar errores por aparición de tonalidades que no corresponden exactamente a la que se observa por la oxidación de la bencidina.
 - 6.2.- *Prueba de Adler* en muestras de sangre diluida: Preparamos en una gradilla 3 tubos de ensayo que contienen cada uno 1 ml de la muestra de sangre de concentración 1/10. A cada uno de ellos le aplicamos la *prueba de Adler*. Si la prueba es negativa, como conclusión debemos
-

decir que la reacción de ADLER no es sensible para la concentración que estamos estudiando. Los resultados los reflejamos en una tabla.

Repetimos el mismo procedimiento utilizando las diferentes diluciones que tenemos preparadas.

7.- Pruebas realizadas sobre manchas en papel:

7.1.- Prueba de control: Realizamos la *prueba de Adler* sobre las manchas correspondientes a la muestra de sangre sin diluir. Con esta experiencia previa, podemos comprobar que las manchas que vamos a estudiar y los reactivos son fiables. También tendremos un modelo del color que indica una reacción positiva.

7.2.- *Prueba de Adler* en manchas de sangre sobre papel: Tenemos preparadas 3 manchas para cada una de las diluciones que queremos estudiar. Aplicamos sobre cada una de ellas la *prueba de Adler*.

8.- Pruebas realizadas sobre una huella de Taylor:

8.1.- Prueba de control: Obtenemos la *huella de Taylor* de la mancha que preparamos a partir de la muestra de sangre sin diluir. A continuación, sobre la huella que se ha obtenido realizamos la *prueba de Adler*. Como en los casos anteriores, consideramos que este paso previo es importante para comprobar la validez de los reactivos y de la técnica que vamos a aplicar a las muestras a estudio, así como para tener un patrón de la coloración que indica el resultado positivo de la prueba.

8.2.- *Prueba de Adler* sobre la *huella de Taylor*: Nos quedan 3 manchas de cada dilución que son las que utilizamos en esta experiencia. De cada una de ellas obtenemos la *huella de Taylor* tal como hemos descrito anteriormente (punto III del método), y comprobamos qué resultado se obtiene al realizar la prueba sobre ellas.

Segundo objetivo. Método experimental:

OBJETIVO: Comprobar la interferencia del zumo de limón en la *prueba de Adler*

- 1.- Obtener la muestra de sangre: Realizaremos las pruebas a partir de sangre recién extraída por punción venosa que guardamos en un tubo de ensayo preparado con heparina como anticoagulante.
 - 2.- Preparar el reactivo de ADLER.
 - 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
 - 4.- Preparación de las disoluciones de sangre.
 - 5.- Preparar las disoluciones de zumo de limón: A partir de zumo de limón puro, que hemos sometido a un proceso previo de centrifugado, preparamos disoluciones de distintas concentraciones. El método es el siguiente: en un tubo de ensayo, ponemos 1 ml de zumo de limón. A continuación añadimos 9 ml de agua destilada, de manera que tenemos una disolución de concentración 1/10 en zumo de limón. A partir de 1 ml de la disolución 1/10 y diluyendo hasta 10 ml, preparamos la disolución de concentración 1/100, y siguiendo el mismo procedimiento, es decir pipeteando 1 ml de una disolución y diluyendo hasta un volumen de 10 ml, obtenemos disoluciones de concentración 1/1000, 1/10000, y 1/100000. Para conseguir las disoluciones comprendidas entre 1/1 y 1/10, también partimos de la solución base, así, por ejemplo para la disolución 1/2, separamos 5 ml de zumo y diluimos hasta 10 ml. Preparamos además un tubo de ensayo con 1 ml de zumo sin diluir. Todos los tubos llevan una etiqueta que indica la concentración y la fecha de preparación de la muestra.
 - 6.- Preparar las muestras en tubo de ensayo: Para empezar nuestra experiencia elegimos la muestra de sangre sin diluir y, en un primer paso, comprobamos si el zumo de limón puro es capaz de
-

impedir la reacción positiva de la bencidina. Así pues, de la muestra de sangre sin diluir, preparamos 4 tubos de ensayo con 1 ml de muestra de sangre en cada uno. A continuación, añadimos en cada tubo 1 ml de zumo de limón sin diluir. Todos ellos llevan una etiqueta que indica la concentración en sangre, la concentración en zumo de limón y la fecha de preparación de la muestra. De los 4 tubos que hemos preparado, 3 de ellos nos sirven para comprobar la validez de la *prueba de Adler* con muestras líquidas, y el cuarto lo utilizamos para preparar manchas en papel, con el fin de realizar la experiencia en dicho soporte, y también mediante la obtención de la *huella de Taylor*.

7.- Preparar las manchas en papel: Obtenemos las manchas correspondientes a la muestra que tenemos preparada en tubo de ensayo, tal como hemos indicado en el punto 6.

8.- Estudiar la *prueba de Adler*:

8.1.- Prueba de control: Comprobamos previamente que la reacción de ADLER no da positiva si se aplica sobre zumo de limón. Preparamos un tubo de ensayo con 1 ml de contaminante y realizamos la *prueba de Adler*. Para poder continuar con nuestra experiencia, la reacción debe ser negativa necesariamente. Se repite la prueba sobre una mancha en papel y su correspondiente *huella de Taylor*. Con estas experiencias nos aseguramos de que en ningún caso, una reacción positiva se deba al contaminante.

8.2.- Prueba de Adler en muestras de sangre líquida que contiene contaminante: Como hemos indicado anteriormente (punto 6), tenemos preparados 3 tubos de ensayo que contienen cada uno de ellos 1 ml de sangre sin diluir y 1 ml de zumo de limón puro. Comprobamos el resultado de la *prueba de Adler* en cada uno de ellos. Si es negativo, como conclusión debemos decir que el contaminante interfiere la reacción de ADLER. En el caso de que la reacción resulte positiva, no realizamos más pruebas con la dilución que estamos estudiando, y pasamos a repetir la experiencia utilizando una muestra de sangre menos concentrada. Si la prueba resulta negativa, repetimos la experiencia a partir del punto 6, utilizando la misma muestra de sangre, pero una solución de contaminante de concentración inmediatamente inferior a la que hemos estudiado; así pues, si estamos trabajando con la muestra que contiene sangre más zumo de limón sin diluir, y obtenemos un resultado negativo, pasamos a trabajar con la muestra que contiene sangre sin diluir y contaminante a una concentración 1/10. Seguiremos disminuyendo la concentración del contaminante hasta conseguir un resultado positivo de la *prueba de Adler*. Los resultados de la prueba los reflejaremos en una tabla.

Como ya hemos indicado, si la reacción da positiva, repetimos la experiencia a partir del punto 6, preparando previamente una muestra de sangre de menor concentración, así pues pasamos a

estudiar una muestra que contiene una concentración de 1/10 en sangre, aplicando el mismo procedimiento.

Con el proceso que hemos seguido, comprobamos que si a una muestra de una concentración determinada de sangre, se le añade 1 ml de una disolución de zumo de limón de concentración conocida, y se somete a la *prueba de Adler*, no se obtiene el resultado positivo, que indica que la muestra contiene sangre. Es decir, la presencia de contaminante inhibe la reacción de ADLER dando lugar a un falso negativo.

8.3.- Prueba de Adler en manchas de sangre sobre papel que contienen contaminante: Tenemos preparadas 3 manchas para la muestra que queremos estudiar sobre las que realizamos la *prueba de Adler*. Si el resultado de la prueba es negativo, optamos por continuar nuestra experiencia sin variar la concentración de la muestra de sangre, pero disminuyendo la de contaminante. En el caso de que el resultado fuera positivo, pasamos a estudiar una muestra de sangre menos concentrada, tal como hemos descrito en el punto 8.2.

8.4.- Prueba de Adler sobre la huella de Taylor: De la muestra que estamos estudiando, nos quedan 3 manchas de las que preparamos según se describió en el punto III del método. De cada una de ellas obtenemos la *huella de Taylor* sobre la que realizamos la prueba. Seguiremos el mismo procedimiento que hemos indicado en el punto 8.2

Tercer objetivo. Método experimental:
--

OBJETIVO: Comprobar la interferencia del ácido ascórbico en la *prueba de Adler*. Ajustar la concentración de ácido ascórbico que es capaz de impedir la reacción de ADLER.

- 1.- Obtener la muestra de sangre: Realizamos las pruebas a partir de sangre recién extraída por punción venosa. Como anticoagulante utilizaremos la heparina.
 - 2.- Preparar el reactivo de ADLER.
 - 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
 - 4.- Preparación de las disoluciones de sangre
 - 5.- Preparar las disoluciones de ácido ascórbico: Según la bibliografía revisada, el zumo de limón puro contiene una cantidad de ácido ascórbico de 0,38 mg/ml. Preparamos una disolución base de ácido ascórbico de esa misma concentración, que utilizamos para realizar las pruebas con las muestras de sangre y además para obtener, por dilución, soluciones menos concentradas de contaminante. El método es el siguiente: Utilizando una balanza analítica, pesamos 38 mg de ácido ascórbico sobre un vidrio de reloj. Para preparar la disolución, pasamos el reactivo a un vaso de precipitados. Como precaución, para no perder reactivo, es conveniente dejar caer una pequeña cantidad de agua destilada sobre el vidrio de reloj, recogiénola en el vaso de precipitados. A continuación, añadimos un poco más de agua destilada para disolver totalmente el ácido ascórbico. Después, pasamos el contenido del vaso a un matraz aforado de 100 ml y enrasamos con agua destilada. En el matraz pegamos una etiqueta en la que se indica el reactivo, su concentración y la fecha de preparación del mismo. Esta disolución es la equivalente a la de concentración 1/1 en zumo de limón que utilizamos en la segunda experiencia.
-

Las disoluciones de menor concentración las obtenemos a partir de nuestra disolución base, separando con una pipeta el volumen necesario y diluyendo con agua destilada. Por ejemplo, la solución equivalente a la de concentración 1/5 en zumo de limón, es decir 0,076 mg/ml en ácido ascórbico, la obtenemos a partir de 2 ml de la disolución 1/1 que ponemos en un matraz aforado de 10 ml y enrasando con agua destilada. Como en todas nuestras experiencias, ponemos una etiqueta en el matraz que indique el reactivo que contiene, su concentración y la fecha de preparación.

Siguiendo el mismo método podemos, si es necesario, seguir preparando disoluciones menos concentradas de ácido ascórbico a partir de otras de mayor concentración.

6.- Preparar las muestras en tubo de ensayo: Empezamos a partir de la muestra de sangre sin diluir y, en un primer paso comprobamos si al añadirle ácido ascórbico de la disolución base que tenemos preparada (punto 5), se puede impedir la reacción de la bencidina. Así pues, de la muestra de sangre sin diluir, preparamos 4 tubos de ensayo con 1 ml de muestra de sangre. A cada uno de ellos, le añadimos a continuación 1 ml de la disolución de ácido ascórbico de concentración 0,38 mg/ml (1/1). Todos los tubos deben llevar una etiqueta que indique la concentración en sangre, la concentración en contaminante y la fecha. Con tres de estos tubos, realizamos la *prueba de Adler*, y el cuarto nos servirá para preparar manchas y comprobar el resultado de la prueba cuando la mancha se analiza en papel o mediante la obtención previa de la *huella de Taylor*.

7.- Preparar las manchas en papel: Obtenemos las manchas a partir de la muestra que hemos preparado según se describe en el punto 6 del método.

8.- Estudio de la *prueba de Adler*:

8.1.- Prueba de control: Tal como hicimos en la segunda experiencia, antes de comenzar el estudio de la capacidad de interferencia del ácido ascórbico en la *prueba de Adler*, comprobamos que la reacción no se produce si se aplica directamente sobre ácido ascórbico. Para esto, preparamos un tubo de ensayo con 1 ml de contaminante y sobre esta muestra comprobamos si la reacción de ADLER da un resultado positivo o negativo. Se repite la prueba sobre una mancha en papel y obteniendo la *huella de Taylor*. Con estos controles previos comprobamos que en ningún caso una reacción positiva se debe al contaminante.

8.2.- Prueba de Adler en muestras de sangre líquida que contiene ácido ascórbico como contaminante: Tenemos preparados 3 tubos de ensayo que contienen cada uno de ellos 1 ml

de sangre sin diluir y 1 ml de ácido ascórbico de la disolución base que preparamos anteriormente, de concentración 0,38 mg/ml. Aplicaremos la *prueba de Adler* a cada una de las muestras. Un resultado negativo de la prueba, nos indica que la presencia del contaminante impide que tenga lugar la reacción de la bencidina. En este caso, pasamos a repetir la experiencia a partir del punto 6, pero preparando nuevas muestras a partir de la misma concentración de sangre, y utilizando una solución de contaminante de concentración inmediatamente inferior a la que hemos estudiado; de esta forma si estamos trabajando con la muestra que contiene sangre más ácido ascórbico de concentración 0,38 mg/ml, y la prueba resulta negativa, pasamos a trabajar con una muestra que contiene sangre sin diluir y contaminante a una concentración inmediatamente inferior. Se sigue la disminución de la concentración del contaminante hasta observar un resultado positivo de la *prueba de Adler*. Los resultados de esta experiencia los indicamos en una tabla.

Por otra parte, si el resultado es positivo, pasamos a realizar la misma experiencia, pero utilizando una muestra de sangre menos concentrada. Es decir, repetimos el procedimiento descrito a partir del punto 6 del método, sin variar la concentración de contaminante y bajando la de sangre.

Con el proceso que hemos seguido, llegamos a conocer que, si tenemos una muestra de una concentración determinada de sangre, y le añadimos 1 ml de una disolución de ácido ascórbico de concentración conocida, conseguimos inhibir la reacción de ADLER. Cuando llegamos a este punto, intentaremos ajustar más los resultados obtenidos. Para esto, preparamos varios tubos de ensayo con 1 ml de muestra de sangre de la dilución que estamos estudiando, y a continuación, añadimos a cada uno de ellos cantidades diferentes de la disolución de contaminante, de la concentración que estemos utilizando en este punto de nuestra experiencia. Así, tenemos muestras en las que ponemos desde 0,9 ml de ácido ascórbico hasta 0,1 ml, de forma que cada una de ellas contiene 0,1 ml menos que la anterior. Aplicamos la *prueba de Adler* y de esta forma, podemos comprobar para qué volumen de contaminante la reacción pasa de ser negativa a dar un resultado positivo. Para calcular correctamente la concentración de ácido ascórbico en la muestra, tendremos que tener en cuenta el factor de dilución, es decir, calcular cuál será la concentración real del contaminante en la muestra, conociendo el volumen total de la misma. Los resultados de esta experiencia los indicaremos en una tabla.

8.3.- Prueba de Adler en manchas de sangre sobre papel que contienen ácido ascórbico como contaminante: Para esta prueba utilizamos 3 de las manchas que hemos preparado anteriormente (punto 7) sobre las que aplicamos la *prueba de Adler*. Si el resultado de la prueba es negativo, continuamos la investigación repitiendo la experiencia sin variar la

concentración de la muestra de sangre, pero disminuyendo la de contaminante. En el caso de que el resultado de positivo, estudiamos una muestra de sangre de menor concentración, tal como hemos descrito en el punto 8.2.

8.4.- Prueba de Adler sobre la huella de Taylor: Nos quedan tres manchas correspondientes a la muestra que estamos estudiando. De cada una de ellas obtenemos la *huella de Taylor*, realizando a continuación la *prueba de Adler* sobre la misma, tal como se indica en el punto 8.2

Cuarto objetivo. Método experimental:
--

OBJETIVO: Comprobar posibles diferencias en los resultados obtenidos anteriormente, si se trabaja con muestras de sangre que han sido sometidas a un proceso de conservación.

- 1.- Obtener la muestra de sangre: Analizamos muestras de sangre que nos proporciona el banco de sangre del Hospital Clínico. Según consta en la etiqueta del envase que contiene la sangre que vamos a utilizar, el conservante que se ha añadido es CPDA-1 y ha estado 35 días en frigorífico a una temperatura de 4-6°C..
 - 2.- Preparar el reactivo de ADLER.
 - 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
 - 4.- Preparar las disoluciones de sangre: Según los resultados que refleja la tabla correspondiente a la primera experiencia, en la que se realiza el estudio la sensibilidad de la *prueba de Adler* con muestras de sangre fresca, preparamos disoluciones de concentración 1/10000, 1/100000, 1/200000, 1/300000, 1/400000 y 1/500000 ya que son las que nos permitirán determinar si existe variación con respecto a la sensibilidad de la prueba.
 - 5.- Obtener las manchas en papel.
 - 6.- Estudiar la sensibilidad de la *prueba de Adler*: Repetir el método que se realizó en la primera experiencia con las muestras que se han preparado.
 - 7.- Comprobar la interferencia del ácido ascórbico: Volvemos a desarrollar todo el método descrito en la tercera experiencia, utilizando la muestra que hemos descrito en el punto 1.
 - 8.- Los resultados que obtenemos los reflejamos en tablas iguales a las que diseñamos para las experiencias 2 y 3. De esta forma podemos comparar los resultados de la prueba con los dos
-

tipos de muestra, y estudiar la influencia de los conservantes y la temperatura en la sensibilidad de la *prueba de Adler*, comprobando si estos factores afectan a la capacidad de interferencia del ácido ascórbico.

Quinto objetivo. Método experimental:

OBJETIVO: Determinar, tanto con sangre pura, como con contaminante, si la antigüedad de la muestra influye en el resultado de la *prueba de Adler*.

- 1.- Obtener la muestra de sangre: Realizamos las pruebas a partir de sangre recién extraída por punción venosa. Utilizaremos como anticoagulante la heparina.
 - 2.- Preparar el reactivo de ADLER.
 - 3.- Llenar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
 - 4.- Preparar las disoluciones de sangre:
 - 4.1.- Preparar las muestras de sangre: Basándonos en los resultados que se han obtenido en la primera experiencia, en la que se analiza la sensibilidad de la *prueba de Adler* con muestras de sangre fresca, preparamos disoluciones de concentración 1/10000, 1/100000, 1/200000, 1/300000, 1/400000 y 1/500000 que son las correspondientes a los límites de sensibilidad de la prueba.
 - 4.2.- Preparar las muestras de sangre a las que añadiremos ácido ascórbico: Según las experiencias que ya hemos realizado, la reacción de ADLER se inhibe por el ácido ascórbico a partir de diluciones de sangre de 1/100 ml de sangre/ml totales de disolución. Preparamos una solución de sangre de esa misma concentración, a partir de la muestra que hemos obtenido según se especifica en el punto 1. Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, preparamos disoluciones de menor concentración a partir de las más concentradas.
 - 5.- Preparar la disolución de ácido ascórbico: Obtenemos una disolución base con una concentración de 0,38 mg/ml en ácido ascórbico que utilizamos para realizar las pruebas con las muestras
-

de sangre y además para obtener por dilución, soluciones menos concentradas. El método es el mismo que ya describimos con detalle en la experiencia número 3.

6.- Preparar las muestras que contienen sangre con ácido ascórbico en tubo de ensayo: Basándonos en los resultados obtenidos en la experiencia 3, preparamos muestras de distintas concentraciones de sangre a las que añadimos ácido ascórbico. La concentración del contaminante, la seleccionamos según la tabla correspondiente a la experiencia 3, para poder comprobar si varía o no la capacidad de interferencia con el tiempo. Como en los casos anteriores, preparamos la suficiente cantidad de muestra que nos permita repetir las pruebas para los periodos determinados, el número de veces suficientes, y preparar las manchas necesarias. Todos los tubos llevan una etiqueta indicando la concentración en sangre, la concentración en contaminante y la fecha.

7.- Preparar las manchas en papel:

7.1.- Preparar las manchas que corresponden a las muestras de sangre sin ácido ascórbico: Obtenemos 24 manchas de cada disolución, 12 de ellas para aplicar la *prueba de Adler* sobre ellas y otras 12 para obtener la *huella de Taylor*.

7.2.- Preparar las manchas correspondientes a las muestras que contienen contaminante: En esta experiencia, a partir de la muestra que hemos preparado en el punto 6.2, obtenemos 24 manchas. Utilizamos la mitad de ellas para realizar la *prueba de Adler* directamente, y la otra mitad, para obtener la *huella de Taylor* y comprobar el resultado de la prueba sobre la huella.

Es importante indicar sobre el papel de filtro que contiene las muestras, las concentraciones de las manchas y la fecha de preparación.

8.- Estudio de la *prueba de Adler*:

El objetivo que queremos conseguir con esta experiencia es conocer la influencia de la antigüedad de la muestra de sangre con y sin contaminante, sobre el resultado de la *prueba de Adler*. El método que proponemos consiste en guardar las muestras, para someterlas a la *prueba de Adler* después de transcurridas 1 semana, 2 semanas y 1 mes, desde la fecha de su obtención. Así pues, después de una semana realizamos las siguientes experiencias:

8.1.- *Prueba de Adler en muestras de sangre diluida*: Realizaremos la prueba sobre las muestras de sangre pura y también con las que contienen ácido ascórbico. El procedimiento que seguimos para cada muestra de las que disponemos es el siguiente: Ponemos en una gradilla 3 tubos de ensayo y añadimos a cada uno de ellos, 1 ml de la muestra que vamos a estudiar, y que tiene una antigüedad de una semana. Con cada uno de ellos, realizamos la *prueba de Adler*.

8.2.- Prueba de Adler en manchas de sangre sobre papel: Aplicaremos la prueba sobre las manchas correspondientes a las distintas diluciones de sangre y a las que se obtuvieron a partir de muestras que contienen ácido ascórbico. Para esto, separamos 3 de las manchas que tenemos preparadas para cada muestra según se describe en el punto 7 y comprobamos el resultado de la *prueba de Adler*.

8.3.- Prueba de Adler sobre la huella de Taylor: También hacemos las pruebas con los dos tipos de muestras que hemos preparado, es decir sangre sin contaminantes y sangre que contiene ácido ascórbico. El método consiste en separar 3 manchas correspondientes a cada muestra, y de cada una de ellas, obtenemos la *huella de Taylor*. Sobre las huellas, comprobamos si se produce la reacción de ADLER.

9.- Repetimos las experiencias descritas en el punto 8, después de transcurridas 2 semanas desde que se preparó la muestra. Guardamos otro de los tubos que analizaremos cuando pase 1 mes desde la fecha de preparación.

Sexto objetivo. Método experimental:

OBJETIVO: Conocer como actúa el ácido ascórbico en la *prueba de Adler*.

- 1.- Preparar la disolución de dióxido de manganeso: Preparamos una disolución a partir de 2 g de dióxido que disolvemos en 100 ml de agua destilada. Si es necesario, se puede calentar la mezcla para conseguir que el reactivo se disuelva por completo. La concentración de la disolución que se obtiene es 0,2 M.
- 2.- Preparar la disolución de permanganato potásico. Elegimos la concentración 1 M como disolución base. Para obtenerla, pesamos 1,58 g de permanganato que se disuelven en 10 ml de agua destilada. A partir de esta disolución base, prepararemos otras más diluidas si los resultados que vamos obteniendo al realizar las pruebas así lo requieren.
- 3.- Preparar la disolución de ácido ascórbico: Como en las pruebas realizadas con sangre, obtenemos una disolución de concentración 0,38 mg/ml.
- 4.- Preparar el reactivo de ADLER.
- 5.- Preparar un frasco cuentagotas con peróxido de hidrógeno.
- 6.- Obtener una muestra de sangre de concentración 1/1000. Preparar un tubo de ensayo con 1 ml de la solución, y varias manchas para realizar las pruebas sobre la mancha directamente y también a partir de la *huella de Taylor*.

I.- PRUEBAS CON OXIDANTES QUIMICOS.

- 1.- Pruebas a realizar con el dióxido de manganeso:
-

1.1.- Pruebas previas: Preparamos un tubo de ensayo con 1 ml de la disolución de dióxido de manganeso y ponemos 2 gotas del reactivo de ADLER. Comprobamos si se produce la oxidación del reactivo sin añadir peróxido de hidrógeno. En el caso de que esto suceda, no utilizaremos el peróxido en las pruebas siguientes.

1.2.- En un tubo de ensayo, preparamos 1 ml de la disolución de dióxido de manganeso. Añadimos ácido ascórbico y a continuación el reactivo de ADLER. Comprobamos si se produce la oxidación de la bencidina.

1.3.- En un tubo de ensayo ponemos 1 ml de dióxido de manganeso y 2 gotas del reactivo de ADLER. A continuación añadimos 1 ml de ácido ascórbico.

1.4.- Preparamos un tubo de ensayo con 2 gotas del reactivo de ADLER y 1 ml de ácido ascórbico (reactivo neutralizado). En otro tubo ponemos 1 ml de dióxido de manganeso y, a continuación añadimos el contenido del primer tubo.

2.- Pruebas a realizar con permanganato potásico:

2.1.- Preparamos un tubo de ensayo con 1 ml de la disolución de permanganato potásico y ponemos 2 gotas del reactivo de ADLER. Comprobamos si se produce la oxidación del reactivo.

2.2.- En un tubo de ensayo, preparamos 1 ml de la disolución de permanganato. Añadimos 1 ml de ácido ascórbico y a continuación 2 gotas del reactivo de ADLER. Comprobamos si se produce la oxidación de la bencidina.

2.3.- En un tubo de ensayo ponemos 1 ml de permanganato y 2 gotas del reactivo de ADLER. A continuación añadimos 1 ml de ácido ascórbico.

2.4.- Preparamos un tubo de ensayo con 2 gotas del reactivo de ADLER y 1 ml de ácido ascórbico (reactivo neutralizado). En un segundo tubo ponemos 1 ml de permanganato y, a continuación, añadimos el contenido del primer tubo.

Estas pruebas las realizaremos en principio con la disolución base de permanganato (1 M), que hemos preparado. A la vista de los resultados que obtengamos, podemos plantearnos el repetirlas utilizando soluciones de oxidante menos concentradas.

II.- PRUEBAS A REALIZAR CON SANGRE:

2.1.- En un tubo de ensayo ponemos una pequeña cantidad de una muestra de sangre de concentración 1/1000, y realizamos la *prueba de Adler*. A continuación añadimos 1 ml de ácido ascórbico.

2.2.- Realizamos la misma prueba utilizando una mancha de sangre.

2.3.- Repetimos el ensayo anterior sobre una *huella de Taylor*
